

## 酸化ストレスによる $\mu$ -カルパインの活性化と NF2蛋白質（マーリン）の分解

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座（主任：山下純宏教授）

金子 拓 郎

神経線維腫症2型 (neurofibromatosis type 2, NF2) の病因遺伝子産物であるマーリンは、代表的な頭蓋内腫瘍である髄膜腫や聴神経鞘腫で高率に異常を示す腫瘍抑制蛋白質である。最近、NF2遺伝子関連腫瘍の発生原因として、遺伝子異常による異常マーリンの産生以外にカルパインの異常活性化による正常マーリンの過剰分解が報告された。髄膜腫は中高年の女性に好発することはよく知られているが、なぜ中高年者においてカルパインの異常活性化が生じやすいかは不明である。本研究では、カルパインを活性化させる一因として老化によるフリーラジカルの発生を想定し、酸化ストレスを加えた培養細胞を用いて $\mu$ -カルパインとマーリンの関係を調べた。検索対象として、手術で得られた髄膜腫組織12例とその培養細胞、および正常マーリンを発現し、活性化型 $\mu$ -カルパイン陰性のヒトグリオーマ由来細胞株U251MGを用いた。その結果、髄膜腫組織では11例でカルパインの活性化がみられるにも関わらず、培養下では全例で活性化は消失し、8例で完全長のマーリンが発現した。各種濃度の過酸化水素処理を用いて酸化ストレスを1時間与えると、活性化型 $\mu$ -カルパインによるマーリンの分解とその分解産物の出現がみられ、同時に、内因性カルパイン阻害蛋白質であるカルバスタチンの減少がみられた。特異的なカルパイン阻害剤であるカルボベンゾキシルロイシロイシナル (carbobenzoxyl-leucyl-leucinal, Z-LLal) (5  $\mu$ M) による処理を行うと、マーリン分解の抑制とカルバスタチンの再蓄積がみられた。蛍光免疫染色では、過酸化水素処理前の完全長マーリンと処理後の $\mu$ -カルパインはいずれも形質膜周囲にみられ、 $\mu$ -カルパインの活性化と共にマーリンは形質膜から細胞質や核膜へと移動していた。以上より、フリーラジカルによる $\mu$ -カルパインの活性化がマーリンを過剰分解し、細胞接着に関わる情報伝達や接触阻害を障害することが髄膜腫の発生の一因であることが示唆された。

**Key words** merlin, calpain, oxidative stress, meningioma

神経線維腫症2型 (neurofibromatosis type 2, NF2) は、約4万人に1人の頻度で発生する常染色体優性遺伝性の疾患である<sup>1)~3)</sup>。この疾患は、原発性の脳腫瘍の約30%を占める髄膜腫や聴神経鞘腫等の良性腫瘍が頭蓋内に多発することを特徴とする<sup>4)</sup>。NF2遺伝子はヒト22番染色体 (22q12) に位置し、595個のアミノ酸残基から成るモエシン-エズリン-ラディキシンに似た情報伝達蛋白質であるNF2蛋白質をコードしている<sup>5)6)</sup>。NF2蛋白質はモエシン-エズリン-ラディキシンの頭文字をとってマーリン (moesin-ezrin-radixin-like protein, merlin) とよばれている。NF2遺伝子の変異は、NF2腫瘍の約50~80%<sup>17)</sup>、特発性髄膜腫の15~35%<sup>8)~11)</sup>、および特発性神経鞘腫の20~60%<sup>9)10)12)13)</sup>に見られる。すなわち、NF2遺伝子の変異のみではこれらの腫瘍の発生メカニズムを説明し得ない。これらの遺伝子変異の大部分はナンセンス変異、あるいはフレームシフト変異であり<sup>14)~16)</sup>、これらによって不完全な蛋白質が合成されるが、この不完全なマーリンは腫瘍組織においては全く検出されない<sup>5)17)18)</sup>ことから、合成後に直ちに分解されていると考えられている。最近、NF2遺伝子の変異がみられない髄膜腫や神経鞘腫

においてもマーリンの発現が認められないことから、蛋白質レベルでのマーリンの分解が示唆された<sup>19)</sup>。すなわち、カルシウム依存性のシステインプロテアーゼであるカルパインが異常に活性化され、活性化型カルパインによってマーリンが特異的に過剰分解されているとする考えである。この考えは、髄膜腫が遺伝子変異だけでなく蛋白質レベルでの障害によっても発生し得ることを指摘したものであるが、なぜ髄膜腫患者においてカルパインが活性化されるかについては不明である。

カルパインは全脊椎動物の細胞で認められ、とりわけ $\mu$ -カルパインとm-カルパインは恒常的に発現している<sup>20)~22)</sup>。試験管内で前者は $\mu$ M、後者はmMレベルのカルシウム濃度で活性化されるが、活性化に必要なカルシウム濃度以外には両者間に生化学的な差異はみられない。いずれも分子量80kDaと30kDaのサブユニットからなるヘテロ2量体であり、細胞内カルシウム濃度が上昇すると活性化型のカルパインは細胞膜に結合する。その際に、小サブユニットは30kDaから17kDaに自己消化し、大サブユニットは80kDaから78kDaの中間型を経て76kDaの活性化型へと自己消化し、基質となる蛋白質の限定分解を行

平成12年11月24日受付、平成13年1月12日受理

Abbreviations : EMA, epithelial membrane antigen; NF2, neurofibromatosis type 2; TBS-T, Tris-buffered saline-Tween 20; Z-LLal, carbobenzoxyl-leucyl-leucinal

う。カルパインは、従来、リン酸化<sup>23)~25)</sup>やフリーラジカルの発生<sup>26)~28)</sup>をはじめ、虚血(再灌流)<sup>24)29)</sup>、アポトーシス<sup>24)27)~30)</sup>、白内障<sup>26)31)</sup>、筋ジストロフィー<sup>32)</sup>、アルツハイマー病<sup>33)</sup>、パーキンソン病<sup>34)</sup>など多くの生理的、病的条件下で活性化されていることが示されている。髄膜腫は中高年の女性に好発する<sup>4)</sup>ことから老化による変化、すなわち加齢に伴うフリーラジカルの発生による酸化ストレスがカルパインを活性化しているのではないかという仮説に基づいて本研究を行った。

本研究では、特にカルパインとマーリンの相関関係を解析することを目的とし、髄膜腫組織では通常マーリンの発現を認めないことから、マーリンを恒常的に発現するヒトグリオーマ由来細胞株U251MGを陽性コントロールとして使用し、酸化ストレスによるマーリンと $\mu$ -カルパインの動態を生化学的に検索した。髄膜腫細胞については、既存の細胞株がないため組織標本にて活性化型 $\mu$ -カルパインの強い発現がみられたが培養後完全に消失し、逆にマーリンの強い発現がみられた髄膜腫の初代培養細胞を主たる検索対象とした。

#### 対象および方法

##### I. 対象

1999年から2000年までに当教室で外科的切除がなされた特発性髄膜腫12例とその初代培養細胞、およびヒトグリオーマ由来の細胞株U251MGを検索の対象とした。髄膜腫の病理組織学的分類は、世界保健機構(World Health Organization)の脳腫瘍分類に従った<sup>35)</sup>。内訳は、髄膜細胞型(meningotheliomatous, grade I)2例、移行型(transitional, grade I)7例、線維芽細胞型(fibroblastic, grade I)1例、微小嚢胞型(microcystic, grade I)1例、ならびに異型(atypical, grade II)1例であった。髄膜腫の標本は摘出術後、すみやかに液体窒素で凍結し、蛋白質を抽出するまで $-130^{\circ}\text{C}$ で保存した。また、髄膜腫組織の一部は摘出後、直ちに無菌的に細切し培養に供した。U251MG細胞および髄膜腫細胞の培養には、10%牛胎児血清(fetal bovine serum)(Gibco BRL, Rockville, USA)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン含有のDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)(Gibco BRL)培地を使用し、湿潤 $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ の条件下で行った。

##### II. 髄膜腫培養細胞の特性付け

髄膜腫は、神経堤組織由来の腫瘍であるため上皮膜抗原(epithelial membrane antigen)を発現し、その有無が、線維芽細胞やリンパ球との鑑別に有用であることが知られている<sup>36)</sup>。したがって、髄膜腫組織から培養した細胞は、免疫染色でEMAの陽性率が90%以上であることを確認した後、以下の実験に供した。

##### III. カルシウムイオノフォア処理

U251MG細胞と髄膜腫の初代培養細胞は、いずれもフラスコ内ではほぼコンフルエントになった時点で、細胞内カルパインを活性化するために培養液中にカルシウムイオノフォアであるイオノマイシン(Sigma, St. Louis, USA)( $5\mu\text{M}$ )を加え1時間処理した。また、イオノマイシンと共に様々な濃度の塩化カルシウムを投与し1時間処理した。対照としては、U251MG細胞を用い、イオノマイシンを加えず塩化カルシウムのみを投与し1時間処理した。

##### IV. 酸化ストレス(過酸化水素投与)

フラスコ内のU251MG細胞ないし髄膜腫の初代培養細胞がほ

ぼコンフルエントになった後、イオノマイシン( $5\mu\text{M}$ )、塩化カルシウム( $10, 20\text{mM}$ )と共に各種濃度( $5-20\mu\text{M}$ )の過酸化水素を投与し1時間処理した。対照としてはU251MG細胞において、イオノマイシンを加えず過酸化水素のみ、あるいは過酸化水素と塩化カルシウムのみを投与し1時間処理した。

##### V. 特異的カルパイン阻害剤であるカルボベンゾキシルロイシルロイシナル(carbobenzoxyl-leucyl-leucinal, Z-LLal)処理

過酸化水素投与時のマーリンの分解が活性化型 $\mu$ -カルパインによることを証明するため、特異的なカルパイン阻害剤であるZ-LLal(ペプチド研究所、大阪)( $5\mu\text{M}$ )による処理を行った<sup>19)22)37)</sup>。フラスコ内のU251MG細胞ないし髄膜腫の初代培養細胞がほぼコンフルエントになった時点で、前者にはイオノマイシン( $5\mu\text{M}$ )と塩化カルシウム( $10\text{mM}$ )、過酸化水素( $5, 10\mu\text{M}$ )、Z-LLal( $5\mu\text{M}$ )を、後者にはイオノマイシン( $8\mu\text{M}$ )と塩化カルシウム( $10\text{mM}$ )、過酸化水素( $10\mu\text{M}$ )、Z-LLal( $5\mu\text{M}$ )を投与し1時間処理した。

##### VI. ウエスタンブロット解析

髄膜腫の組織はPBS中で超音波破碎した。一方、培養細胞はトリプシン-EDTA(Gibco BRL)処理後、冷PBSにて洗浄し $1,000\text{rpm}$ の遠心にて沈殿させ回収した後PBS中で超音波破碎した。破碎後、直ちに各々を $4^{\circ}\text{C}$ 、 $15,000\text{rpm}$ で10分間遠心し上清を回収後、等量の10%2-メルカプトエタノールを含むSDS緩衝液を加え $100^{\circ}\text{C}$ で5分間加熱した。電気泳動はLaemmli<sup>38)</sup>のSDS-PAGE法により行った。6%と8%のポリアクリルアミドゲル(岩城硝子、千葉)を用い、各レーンあたり $10\mu\text{g}$ の蛋白質を泳動した。電気泳動終了後、アクリルアミドゲル上に分離された蛋白質をニトロセルロース膜(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)に転写し、1%ゼラチン(Bio-Rad, Hercules, USA)を加えた0.1%Tween 20(和光純薬工業、東京)入りトリス塩酸緩衝液(Tris-buffered saline-Tween 20, TBS-T)にて1時間ブロッキングした。一次抗体としては、抗マーリン抗体(C-18, Santa Cruz Inc, Santa Cruz, USA)を2,000倍、抗 $\mu$ -カルパイン抗体を1,000倍(D-rich, 理化学研究所脳科学総合研究センター西道隆臣博士より供与およびChemicon International Inc, Temecula, USA)、抗活性化型 $\mu$ -カルパイン抗体(理化学研究所脳科学総合研究センター西道隆臣博士より供与、および東京大学医科学研究所大海 忍博士より供与)を1,000倍、抗カルパスタチン抗体(CSL1-5, 宝酒造、京都)を4,000倍、ならびに $\alpha$ -チューブリン(TU-02, Santa Cruz Inc)を2,000倍にそれぞれ1%ゼラチン入りTBS-Tで希釈し、室温2時間あるいは $4^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。その後、HRP標識抗ウサギIgG抗体またはHRP標識抗マウスIgG抗体(Amersham)と1時間反応させた後、ECLキット(Amersham)にて発光させ撮影した。内部コントロールとしては、 $\alpha$ -チューブリンを用いた<sup>19)39)</sup>。

##### VI. 免疫細胞化学染色

チャンバースライド(岩城硝子)にて培養した細胞を冷PBSで洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで数分間固定した。その後、PBSで洗浄し0.3%過酸化水素加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼを失活させた。抗原賦活処理のため0.1Mクエン酸緩衝液にスライドガラスを入れ、15分間のマイクロウェーブ処置を行った。非特異的反応抑制のため、ブロッキング抗体(正常血清)を室温で20分間作用させた。一次抗体は抗

EMA抗体 (Dako Japan, 京都) をそのまま用い4℃で一晩反応させた。対応するビオチン化二次抗体 (Vector Laboratories Inc., Durham, USA) を30分間反応させた。アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法と0.005%過酸化水素加0.02%ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine) (Sigma) 処理により発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。

## VII. 蛍光免疫細胞化学染色

免疫染色と同様、抗原賦活処理のため0.1Mクエン酸緩衝液にスライドガラスを入れ15分間のマイクロウェーブ処置を行った。その後、5%ヒツジ血清と0.5% Triton-X (和光純薬工業) 入りPBSにて20分間ブロッキングを行った。免疫染色と同様、一次抗体としては、5%ヒツジ血清と0.5% Triton-X入りPBSを用いて抗マーリン抗体を100倍、抗 $\mu$ -カルパイン抗体を100倍に希釈し4℃で一晩反応させた。PBSで洗浄後、遮光下で二次抗体以降の反応を進めた。フルオロロセンイソチオシアネ酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 結合二次抗体を、2.5%ヒツジ血清と0.25% Triton-X入りPBSで200倍に希釈して1時間反応させた。その後、PBSで洗浄し、核染はPropidium Iodide (PI) (Eugene, Oregon, USA) をPBSで4,000-5,000倍に希釈して5分間反応させて行った。封入後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss, Esslingen, Germany) で観察した。

## 成 績

### 1. 髄膜腫細胞における活性化型 $\mu$ -カルパインの消失 (図1)

活性化型 $\mu$ -カルパインのみを認識する抗体を用いてウエスタンブロットを行うと、髄膜腫組織の12例中8例で活性化型 $\mu$ -カルパインは強く発現しており3例で軽度の発現を示した。しかし、マーリンに関しては、全例において発現がみられなかった (図1A)。これらの髄膜腫組織を培養したところ (図1B)、組織標本で $\mu$ -カルパインの活性化がみられた11例すべてにおいて、活性化型 $\mu$ -カルパインは完全に消失していた。一方、マーリンに関しては、組織標本において活性化型 $\mu$ -カルパインが強陽性を示した8例中7例で、軽度陽性を示した3例中1例で程度の差はあるが発現がみられた。組織標本において $\mu$ -カルパインの活性化がみられなかった例に関しては、培養後も

マーリンの発現はみられなかった。

なお、以下全てのウエスタンブロット解析において、負荷前のU251MG細胞を完全長マーリンの陽性コントロール、活性化型 $\mu$ -カルパインの陰性コントロールとして用いた。

### II. U251MGにおけるマーリンと $\mu$ -カルパイン

#### 1. カルシウム存在下でのマーリンと $\mu$ -カルパイン (図2)

今回、用いた培養液中には既に2mMの塩化カルシウムが含まれていたが、この培養液ではカルパインの活性化はみられなかった。しかし、イオノマイシンを培養液中に5 $\mu$ M添加することで中間型の $\mu$ -カルパインのバンドが検出され、それと共に完全長マーリンは分解され、断片と思われる35kDaのバンドがみられた。さらに、塩化カルシウムを5, 10, 20mM加えると、 $\mu$ -カルパインの活性化は濃度依存性に認められた。しかし、マーリンの分解産物の発現量は塩化カルシウム濃度には比例しなかった。

#### 2. 酸化ストレスによる $\mu$ -カルパインの活性化 (図3)

上記の実験結果に基づき、添加する塩化カルシウムの濃度を10mM、イオノマイシンの濃度を5 $\mu$ Mに統一し、過酸化水素を5, 10, 20 $\mu$ M加えた。過酸化水素の濃度が5, 10 $\mu$ Mの時は投与しない場合より、明らかに活性化型 $\mu$ -カルパインは強陽性所見を示し、同時に完全長マーリンはほとんど検出されなくなった。しかし、さらに過酸化水素の濃度を20 $\mu$ Mにまで上昇させると $\mu$ -カルパインは再び活性化前の状態に戻った。

なお、以下全てのウエスタンブロット解析において、髄膜腫組織 (図3, 右端のレーン) は、中間型および活性化型 $\mu$ -カルパインの陽性コントロール、完全長マーリンの陰性コントロールとして用いた。

#### 3. イオノマイシン非存在下 (図4)

過酸化水素による $\mu$ -カルパインの活性化が、細胞内へのカルシウムイオン流入を促進した結果であることを確かめるために、イオノマイシンの非存在下で塩化カルシウムと過酸化水素を色々な濃度で加えた。その結果、イオノマイシンの非存在下では、 $\mu$ -カルパインの活性化は全く認められず、マーリンの

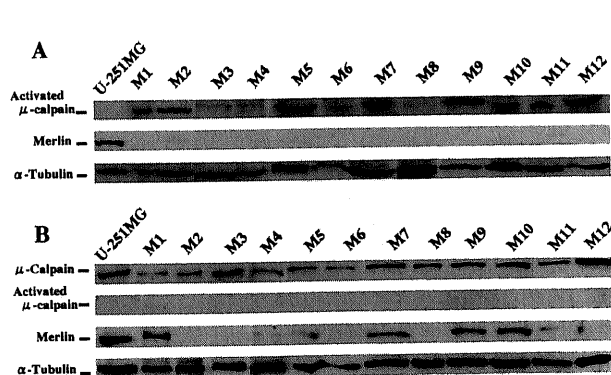


Fig. 1. Western blot analysis for  $\mu$ -calpain, activated  $\mu$ -calpain and merlin in the meningioma tissues (A) and the primary cultured cells (B). U251MG cells were used as a positive control of merlin and negative control of activated  $\mu$ -calpain.  $\alpha$ -Tubulin was used as an internal control. In the meningioma tissues, activated  $\mu$ -calpain was strongly expressed in 8 out of 12 cases while merlin was not expressed (A). In contrast, activated  $\mu$ -calpain was never expressed while half of them expressed merlin as primary cultured meningioma cells (B).

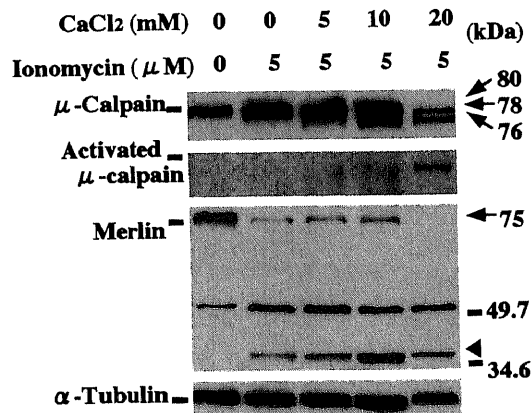


Fig. 2. Western blot analysis for  $\mu$ -calpain, activated  $\mu$ -calpain and merlin in the U251MG cells, being treated with the indicated concentrations of  $\text{CaCl}_2$  and ionomycin for 1 hr.  $\mu$ -Calpain was activated  $\text{CaCl}_2$ -dependently. Full-length (75 kDa) merlin (arrow) was cleaved (arrow head) after treatment with  $\text{CaCl}_2$  and ionomycin.

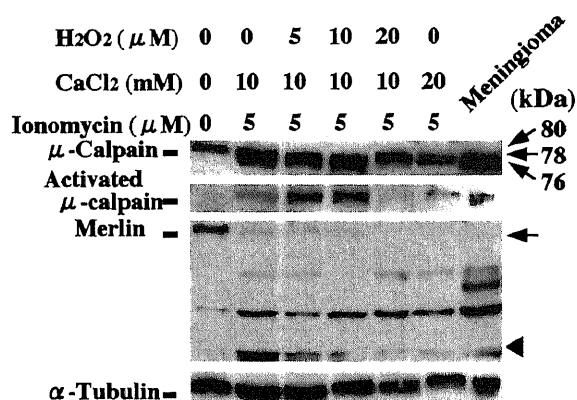


Fig. 3. Western blot analysis for μ-calpain, activated μ-calpain and merlin in the U251MG cells, being treated with the indicated concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> and ionomycin for 1 hr. After treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, activated μ-calpain increased in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent manner until the concentration of 10 μM. In contrast, the full-length merlin (arrow) was cleaved (arrow head) after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

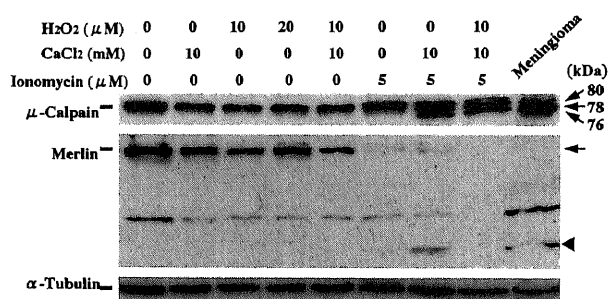


Fig. 4. Western blot analysis for μ-calpain and merlin in the U251MG cells, being treated with the indicated concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> with or without ionomycin for 1 hr. Under this condition, μ-calpain was not activated and the full-length merlin (arrow) was not cleaved (arrow head) at all without ionomycin. This showed a remarkable contrast with the features without ionomycin.

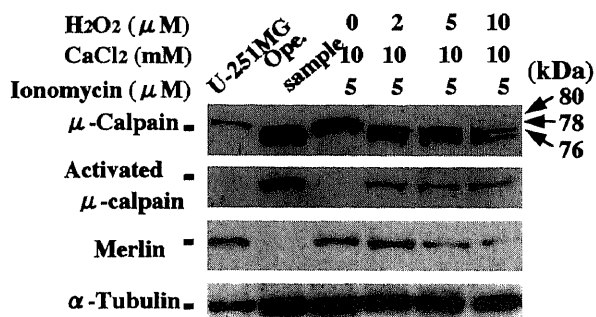


Fig. 5. Western blot analysis for μ-calpain, activated μ-calpain and merlin in the primary cultured meningioma cells (M10), being treated with the indicated concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> and ionomycin for 1 hr. μ-Calpain was not activated without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while merlin expression decreased in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent manner.

分解も認めなかった。

### Ⅲ. 髄膜腫細胞におけるマーリンとμ-カルパイン

髄膜腫においては、組織標本のウエスタンブロット解析にて活性化型μ-カルパインが強陽性で、培養下で完全長のマーリンの発現がみられた1例(図1, M10)を典型例としてU251MG細胞と同様の解析を行った。

#### 1. 酸化ストレスによるμ-カルパインの活性化(図5)

添加する塩化カルシウムの濃度を10mM, イオノマイシンの濃度を5 μMに統一し、過酸化水素を0, 2, 5, 10 μM加えた。過酸化水素なしの状態ではμ-カルパインの活性化もマーリンの分解もみられなかった。しかし、過酸化水素の添加により、カルパインは自己消化し中間型、活性化型となった。完全長マーリンは、過酸化水素の濃度が2 μMでは分解されず、5 μMと10 μMの時に分解がみられた。分解の程度は過酸化水素の濃度にほぼ比例していた。

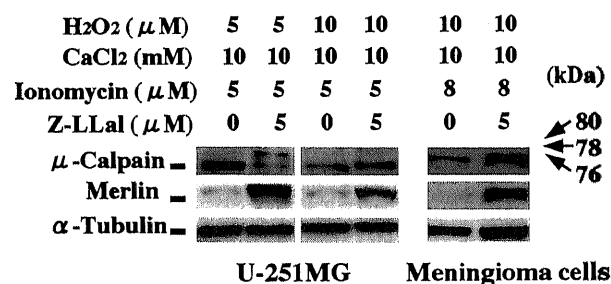


Fig. 6. Western blot analysis for μ-calpain and merlin in both the U251MG cells and the primary cultured meningioma cells (M10), being treated with the indicated concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ionomycin, and Z-LLal for 1 hr. Each of them expressed full-length merlin increasingly after the treatment with Z-LLal, which specifically inhibits the proteolysis by activated calpain.

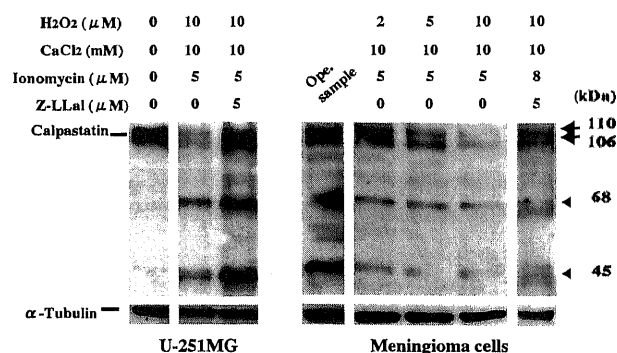


Fig. 7. Western blot analysis for calpastatin in the U251MG cells and the primary cultured meningioma cells (M10), being treated with the indicated concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ionomycin, and Z-LLal for 1 hr. In the U251MG cells, the full-length calpastatin (arrow) was expressed at first, but cleaved (arrow heads) after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Z-LLal inhibited calpastatin degradation. In the meningioma tissue, the cleavages of calpastatin had been expressed (lane of "Opc. sample"). After culture, the full-length calpastatin decreased in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent manner, and Z-LLal inhibited the calpastatin degradation.



## Ⅳ. カルパイン特異的阻害剤の効果 (図6)

カルパインの特異的阻害剤であるZ-LLalを酸化ストレス時に $5\mu\text{M}$ 加えると、U251MG細胞、髄膜腫の初代培養細胞いずれにおいてもマーリンの分解は程度の差はあるものの有意に抑制

された。U251MG細胞においては、特に過酸化水素 $5\mu\text{M}$ 、塩化カルシウム $10\text{mM}$ 、イオノマイシン $5\mu\text{M}$ の条件下で、一方、髄膜腫の初代培養細胞においては、過酸化水素 $10\mu\text{M}$ 、塩化カルシウム $10\text{mM}$ 、イオノマイシン $8\mu\text{M}$ の条件下で、マーリン

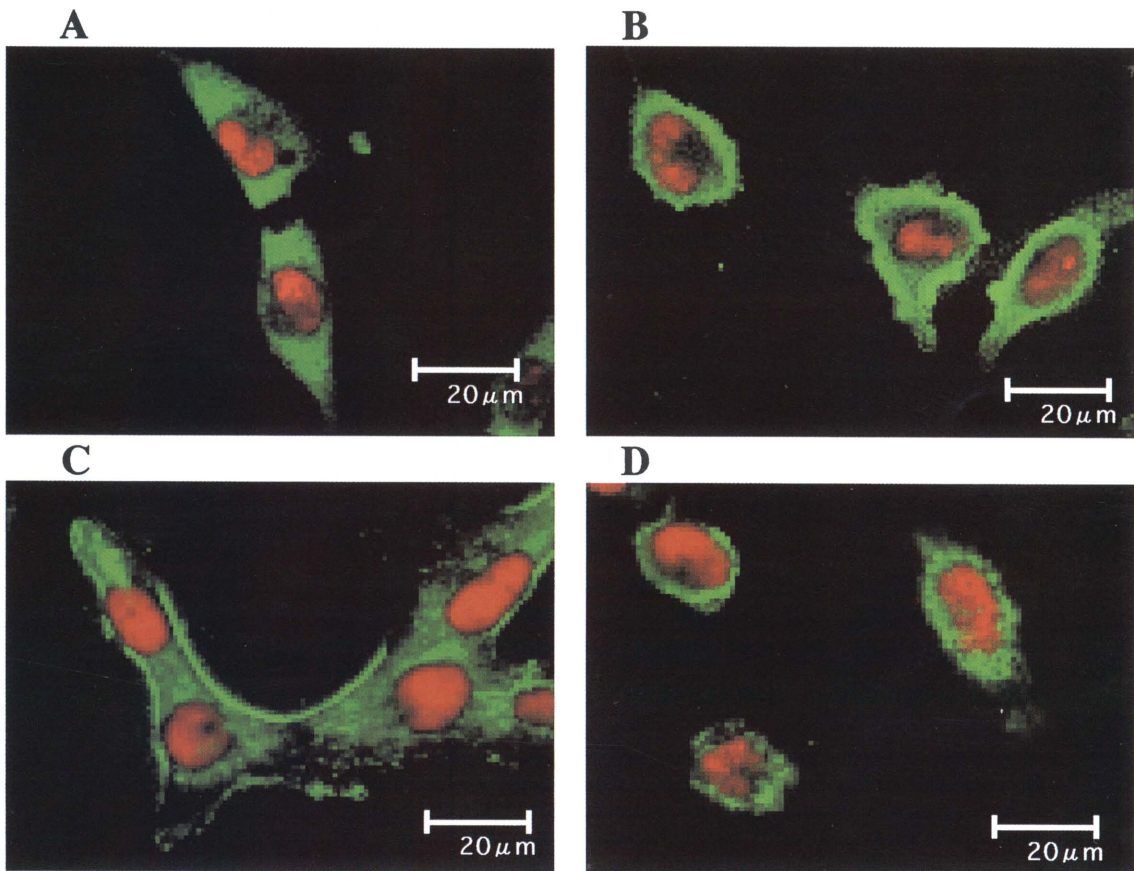


Fig. 8. Immunofluorescence microscopy for  $\mu$ -calpain (A, B) and merlin (C, D) in the U251MG cells. Before treatment with hydrogen peroxide,  $\mu$ -calpain was expressed in the cytoplasm (A), while the full-length merlin was expressed in the plasma membrane (C). After treatment with hydrogen peroxide,  $\mu$ -calpain transferred to the plasma membrane (B), while the fragment of merlin transferred to the perinuclear and cytoplasmic region (D).

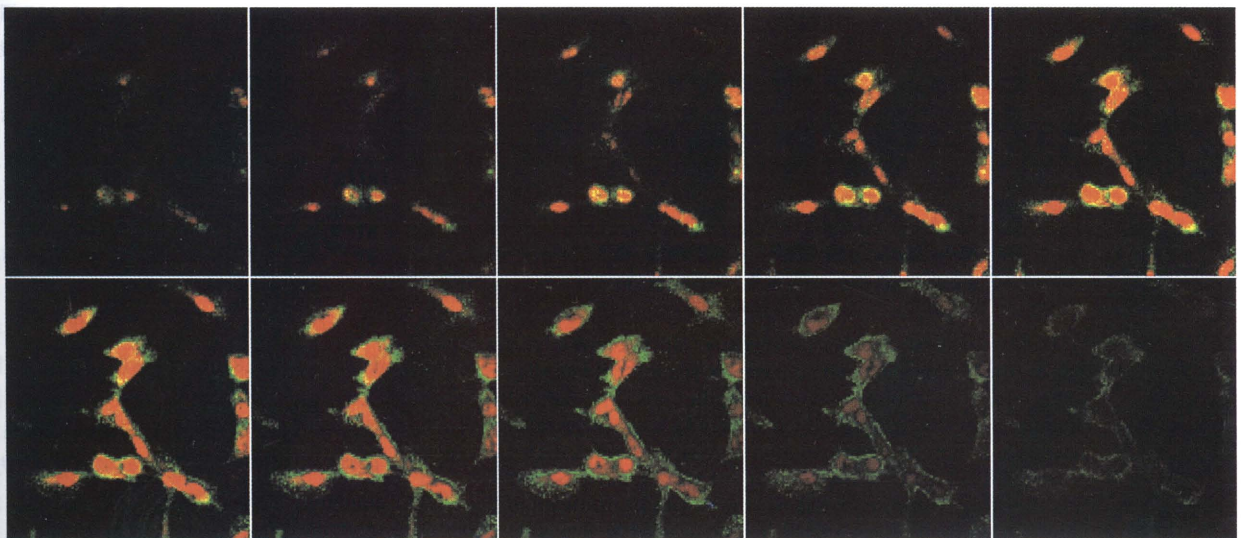


Fig. 9. Every  $1\mu\text{m}$  slice images of the immunofluorescence microscopy for merlin in the U251MG cells, which were treated with hydrogen peroxide. After treatment with hydrogen peroxide, the fragment of merlin transferred to the nuclear region.

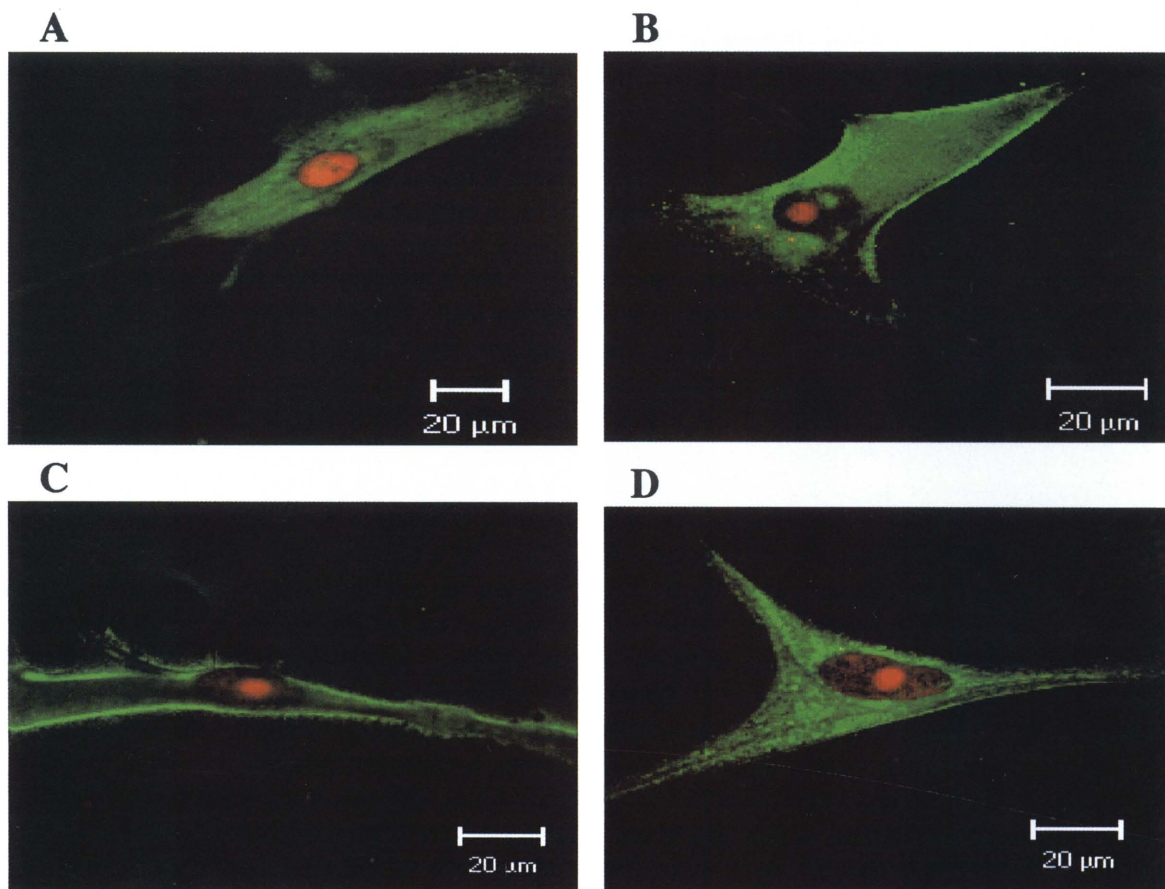


Fig. 10. High magnification of the immunofluorescence microscopy for  $\mu$ -calpain (A, B) and merlin (C, D) in the primary cultured meningeoma cells (M10). Similar to the U251MG cells, before the treatment with hydrogen peroxide,  $\mu$ -calpain was in the cytoplasm (A), while the full-length merlin was in the plasma membrane (C). In contrast, treatment with hydrogen peroxide,  $\mu$ -calpain was expressed in the plasma membrane (B), and the fragment of merlin was expressed in the perinuclear and cytoplasmic region (D).

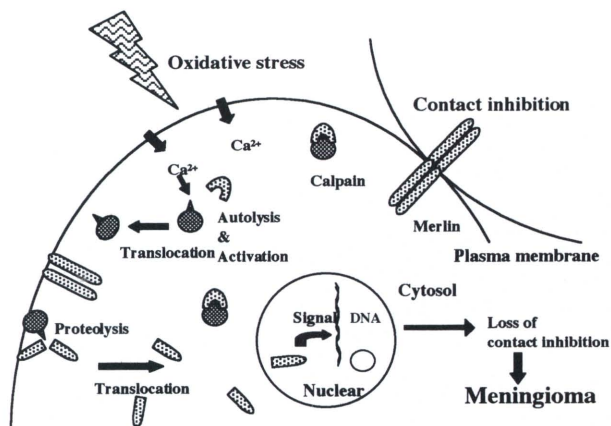


Fig. 11. The scheme of meningeoma tumorigenesis, that can be induced by oxidative stress. At first, the oxidative stress due to aging, induces the  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization, and  $\text{Ca}^{2+}$  activates calpain. Subsequently, the autolyzed and activated calpain translocates from the cytoplasm to the plasma membrane. At the plasma membrane, merlin is cleaved by the activated calpain, and this cleavage product transferred into the nucleus. Accordingly, the signal pathway for cell adhesion and the contact inhibition may be impaired, leading to meningeomas.

の分解は強く抑制され完全長マーリンが蓄積していた。しかし、 $\mu$ -カルパインの活性化はほとんど抑制されていなかった。

#### V. カルパイン阻害蛋白質カルパスタチンの動向 (図7)

カルパインの内因性阻害蛋白質であると同時にカルパインの基質でもあるカルパスタチン<sup>40)~43)</sup>は、負荷前のU251MG細胞では110kDaと106kDaの完全長の蛋白質がみられたが、過酸化水素の添加によりその完全長のバンドは減少し、分解産物と思われる68kDaと45kDaのバンドがみられた。しかし、カルパイン阻害剤であるZ-LLalによる処理を行うと、再び110kDaと106kDaのバンドが増加した。髄膜腫初代培養細胞においても同様に、過酸化水素の濃度の上昇に伴い完全長のカルパスタチンは減少し、Z-LLalの処理により再び110kDaと106kDaのバンドが増加した。

#### VI. マーリン、 $\mu$ -カルパインの細胞内局在の変化 (図8, 9, 10)

U251MG細胞にて蛍光免疫染色を行うと、 $\mu$ -カルパインは負荷前は細胞質全体に陽性を示したが (図8A), 過酸化水素添加により形質膜で強く陽性を示すようになった (図8B)。一方、マーリンに関しては負荷前には形質膜で強く発現していたが (図8C), 過酸化水素添加後は核周囲に発現を示す傾向がみられた (図8D, 図9)。すなわち、酸化ストレス後の $\mu$ -カルパインの局在と完全長マーリンの局在は、ほぼ一致していた。ただし、



過酸化水素添加後、マーリンが細胞質全体に発現している細胞も一部みられた。この傾向は髄膜腫細胞においても同様にみられた(図10)。

## 考 察

### I. ERM (ezrin-radixin-moesin) 蛋白質群とマーリン

マーリンは、そのアミノ酸配列から、バンド4.1スーパーファミリーに属するエズリン、ラディキシン、モエシンなどのERM蛋白質群と高い相同性を示す<sup>44)~49)</sup>。マーリンの機能に関しては現在なお不明であるが、ERM蛋白質群においてはその構造と機能がほぼ解明されている。すなわち、ERM蛋白質群はほとんどの細胞において、アミノ基末端側の約30kDaの領域で細胞膜の糖蛋白質に結合し、カルボキシル基末端側の $\alpha$ -ヘリックスに富む領域で細胞骨格蛋白と結合している<sup>49)</sup>。試験管内の実験において、通常、非活性化の状態ではERM蛋白質群は細胞質に局在し、アミノ基末端側とカルボキシル基末端側が分子内結合した状態で、アクチンフィラメントと膜の結合を抑制している。しかし、カルボキシル基側でのトレオニン残基のリン酸化とアミノ基側でのホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸(PIP<sub>2</sub>)結合の両者によって、分子内結合が抑制され細胞質から形質膜へ移動するとされている<sup>44)50)51)</sup>。G-蛋白質の一つであり、アクチンによる細胞骨格形成の調節因子であるRhoタンパクと、ERM蛋白質群の活性化が密接に関係していることも最近報告されている<sup>44)52)53)</sup>。すなわち、Rhoタンパクが何らかのシグナルを受け活性化すると細胞質に存在するERM蛋白質群は活性化され、形質膜に集まって微絨毛を形成する。一旦活性化したERM蛋白質は、Rhoタンパクをさらに活性化するという陽性のフィードバック機構が働いている。一方、ERM蛋白質群の発現を抑制させると微絨毛が形成されなくなり、ニューロンでは細胞の形態や運動性、突起形成に障害が生じる。逆に、ERM蛋白質を過剰産生させると細胞接着が増強するとされている<sup>44)54)55)</sup>。以上のことから、ERM蛋白質群はアクチンフィラメントと形質膜間の架橋として、細胞骨格の形成あるいは保持に強く関わっているものと推定される。

一方、マーリンはERM蛋白質群とは特にアミノ基側の3分の2においては高い相同性を示すが、他のERM蛋白質群と異なりカルボキシル基側のアクチン結合部位を持っていない<sup>19)44)~49)</sup>。したがって、マーリン特有のカルボキシル基側の構造が、他のERM蛋白質群には無い腫瘍抑制機能と関連しているのではないかと推察されている<sup>45)</sup>。したがって、両者の高い相同性から、マーリンもその機能の一つとして形態膜との結合や細胞骨格構成に関わっていると考えられている<sup>44)48)</sup>。上述のRhoタンパクはマーリンと結合し得ることも報告されており<sup>44)56)</sup>、腫瘍発生の一因として、マーリンの機能喪失がRhoタンパクのシグナル経路を障害することも推察される。他のERM蛋白質群と同様、本研究においても、マーリンに関しては形質膜での細胞内局在が確認され(図8, 9, 10)、形質膜においてマーリンは活性化型 $\mu$ -カルパインにより分解されている可能性が高い。

### II. 酸化ストレスによる $\mu$ -カルパインの活性化

NF2遺伝子関連腫瘍においてはマーリンが検出されないこと、およびほとんどのNF2患者に腫瘍が発生するという事実から、マーリンの腫瘍抑制機能の喪失がNF2遺伝子関連腫瘍の発生の原因と推定される<sup>5)19)57)</sup>。特発性の髄膜腫を含めたNF2遺伝子関連腫瘍の発生原因として、以前から知られている遺伝子

変異<sup>1)~3)5)~13)</sup>やヘテロ接合状態の喪失(loss of heterozygosity)<sup>58)~60)</sup>以外に、異常に活性化したカルパインによる蛋白質レベルでの正常マーリンの過剰分解が最近報告され注目されている<sup>19)</sup>。

#### 1. 活性化型 $\mu$ -カルパインとマーリンの動向

本研究においては、髄膜腫の発生に際してカルパインが活性化される原因を究明することを目的とした。髄膜腫の組織ではカルパインの活性化が恒常的にみられるにも関わらず、それらを培養すると全例において活性化はみられず一部では完全長マーリンの蓄積がみられた。すなわち、生体内においてはカルパインの活性化によってマーリンが過剰分解されていることが示唆され(図1)、カルパインの異常活性化が髄膜腫の発生や増殖に関与していることが推測された。髄膜腫患者は、中年に多発することから加齢によるフリーラジカルの発生が髄膜腫患者において、カルパインを活性化しているのではないかと仮説に基づき、本研究では酸化ストレスの実験モデルとして過酸化水素を用いた。

一般に、生体内において酸化的代謝の過程ではフリーラジカルが恒常的に発生している。フリーラジカルの大部分は代謝酵素や抗酸化物質により除去されるが、消去されなかった一部のフリーラジカルにより蛋白質や脂質、核酸は変性を受ける。生理的状态ではその変性部位は分解酵素により除去され、傷害が急速に蓄積することはないが経年的に緩徐に蓄積した場合には老化現象の一つとなり得ると言われている<sup>61)62)</sup>。

U251MG細胞と髄膜腫細胞とを比較すると、ともに酸化ストレス時に $\mu$ -カルパインの活性化と正常マーリンの分解を示した(図3, 5)が、マーリンをほぼ消失させるのに必要な条件に関して顕著な差異がみられた。すなわち、U251MG細胞ではイオノマイシン $5\mu\text{M}$ のみの添加でほとんど正常マーリンは分解されていた(図2)のに対し、髄膜腫細胞ではイオノマイシン $8\mu\text{M}$ 、塩化カルシウム $10\text{mM}$ 、過酸化水素 $10\mu\text{M}$ の投与条件でようやく正常マーリンは消失した(図6)。この結果から判断すると、活性化型 $\mu$ -カルパインによるマーリンの分解は決して髄膜腫に特異的な反応ではなく、活性化も分解の程度も試験管内では、むしろ髄膜腫細胞の方が弱いと考えられる。にもかかわらず、カルパイン-マーリンカスケードが髄膜腫の発生につながるメカニズムとして、髄膜腫患者の生体内では $\mu$ -カルパインの活性化を助長する因子が働いていることが考えられる。すなわち、カルパインを活性化させる因子として、酸化ストレス以外にもリン脂質やその他アクチベーター蛋白質の関与が報告されている<sup>23)63)~65)</sup>。Yamashimaら<sup>66)67)</sup>は、髄膜腫の細胞膜の内外でミエリン様構造を示すリン脂質が高頻度に観察されることを報告している。これらのリン脂質がカルパインの活性化と必要なカルシウム濃度の閾値を下げているのであろう。

U251MG細胞においては、過酸化水素の濃度が $20\mu\text{M}$ まで上昇すると、 $\mu$ -カルパインは活性化前の状態に戻った。この原因としては、細胞にかかるストレスが余りにも強すぎたため、より短時間に $\mu$ -カルパインが活性化しマーリンが過剰分解され、その後、基質であるマーリンを失った $\mu$ -カルパインは活性化前の状態に戻ってしまったと推定される。

#### 2. カルパインによる蛋白質分解の抑制

Z-LLalの処理ではU251MG細胞、髄膜腫の初代培養細胞いずれにおいても、 $\mu$ -カルパインによるマーリンの分解は抑制され完全長マーリンが蓄積していた(図6)。このことは、マーリ

ンが活性化したカルパインによって恒常的に過剰分解されていることを示している。

カルパスタチンはカルパインの自己消化と活性化を阻害するため、カルパインに対して3箇所の作用部位をもっている<sup>68)~72)</sup>。すなわち、カルパインのカルシウム結合ドメイン<sup>73)</sup>であるドメインIVとドメインVIに作用する部位の2箇所、および、活性中心<sup>73)</sup>付近に作用することで活性を阻害している。カルパスタチンがカルシウム濃度依存的にカルパインを阻害する際には、これら3箇所の部位に同時に作用すると考えられている。そして、カルパスタチンはカルパインの活性化も阻害する一方、カルパインの基質であることも知られている<sup>40)~43)</sup>。今回、酸化ストレスを加えた際、さらに同時にZ-LLalで処理した際のウェスタンブロット解析では、U251MG細胞と髄膜腫の初代培養細胞の両者において、酸化ストレスによる完全長カルパスタチンの減少とZ-LLal処理による再蓄積が確認されたが(図7)、この結果は従来の報告と矛盾しない。髄膜腫組織では、カルパスタチンの分解産物がみられたことより、カルパスタチンによるカルパインの制御機構は消失しているものと思われる。

以上の結果から、髄膜腫患者の生体内では、カルパインの異常活性化による攻撃因子の増強とカルパスタチンの減少による防御因子の減弱の両者によって、マーリンの分解が行われているものと推定される。

### 3. $\mu$ -カルパインとマーリンの局在の変化

免疫染色では(図8, 9, 10)、負荷前のマーリンと酸化ストレス後の $\mu$ -カルパインはいずれも形質膜上で強い発現がみられたことより、両者は細胞内での相互作用が十分に可能な位置に存在しているものと思われる。すなわち、酸化ストレスは、細胞内のカルシウムイオン動態を惹起し、 $\mu$ -カルパインを活性化させると同時に形質膜へ移動させ、二次的にマーリンの過剰分解を行っていることが想像される<sup>74)</sup>。マーリンの分解後の局在に関しては、遺伝子異常によって産生された不完全なマーリンは、アミノ基末端側での変異の場合、合成後に核周囲へ移動するとの報告がある<sup>75)</sup>。しかし、蛋白質レベルで分解をうけたマーリンの細胞内局在に関してはこれまで詳細な報告がない。本研究においては、形質膜に存在していた完全長マーリンは、酸化ストレスが惹起した活性化型カルパインによる分解を受け、その分解産物は細胞質や核膜への局在変化を示した。本来、形質膜において機能を発揮すべきマーリンが過剰分解によって細胞内局在を変えたことが、細胞間の接着情報を伝達しにくくしているものと推定される。

### Ⅲ. 蛋白質分解による腫瘍発生(図11)

従来の発癌メカニズムは発癌遺伝子、癌抑制遺伝子の変異という遺伝子レベルの異常のみで説明されている。髄膜腫においてもNF2遺伝子の異常が指摘されているが<sup>1)~3)5)~16)</sup>、これだけでは髄膜腫の全症例における腫瘍発生メカニズムを説明し得ない。そこで、Kimuraら<sup>19)</sup>はカルパインによるマーリン分解に起因する腫瘍発生という独創的なメカニズムを提唱した。カルパインは多くの細胞骨格蛋白質を基質とし、ERM蛋白質群の中でもエズリンが基質であることは既に知られており、ERM蛋白質群の不活性化の一因として蛋白質レベルでの分解が示唆されている<sup>44)76)77)</sup>。Kimuraら<sup>19)</sup>はエズリンと相同性の高いマーリンもカルパインの活性化により、過剰分解されているのではないかと仮説を立て、それを証明した。したがって、この学説に基づき、「髄膜腫患者の生体内で、なぜカルパインが活性

化されているのか」を調べることは、髄膜腫に特異的な腫瘍発生メカニズムを解明し、新しい治療法を開発するために不可欠であると推察される。

本研究においては酸化ストレスによって生じる活性化型 $\mu$ -カルパインがマーリンを過剰分解することを証明した。すなわち、髄膜腫の発生あるいは増殖の誘因の一つとして、中高年者の生体内で、老化によって産生されたフリーラジカルの関与が強く疑われた。以前より放射線治療後に二次性の髄膜腫が発生することが知られているが<sup>78)</sup>、このような事実も髄膜腫の発生にフリーラジカルが密接に関与していることを示唆するものである。

今回用いたU251MG細胞と髄膜腫の初代培養細胞においては、 $\mu$ -カルパインの活性化とマーリンの分解に必要な塩化カルシウムや過酸化水素の濃度には明らかな差異が見られた。したがって、髄膜腫の発生や増殖に関しては、カルパインの異常活性化を助長する他の因子の存在も重要であると思われる。現在まで、マーリンの過剰発現による細胞運動性の阻害<sup>79)~82)</sup>やカルシウム拮抗剤による髄膜腫の増殖抑制<sup>36)83)</sup>、また上述のERM蛋白質群の生理的機能から推測されるマーリンの細胞骨格形成への関与<sup>79)~81)</sup>などが報告されている。マーリンの腫瘍抑制機能に関して正確なことは現時点では不明であるが、マーリンによる細胞膜から核への情報伝達機構に異常が生じると髄膜細胞相互間の接触阻害が働かず、細胞増殖のシグナル停止がかからないため腫瘍化するものと推定される。髄膜腫は一般的に良性腫瘍であるが、発生部位が頭蓋底であると手術摘出が困難であることも多く、また、一部の悪性のものは手術だけでは根治が不可能であり再発をくり返す。今後、髄膜腫におけるカルパインの活性化機構や抑制化機構、ならびに、マーリンとカルパインの相関関係をさらに明らかにすることで、髄膜腫のみならずNF2関連腫瘍の病態解明と新しい治療法の開発につながることを期待される。

## 結 論

髄膜腫の腫瘍化における酸化ストレスの役割を解明するために、腫瘍抑制蛋白質マーリンと分解酵素カルパインとの相関関係について、U251MG細胞と髄膜腫細胞を用いて検索し、以下の結果を得た。

1. U251MG細胞において、酸化ストレスによる $\mu$ -カルパインの活性化とマーリンの分解、および分解産物を認めた。
2. 髄膜腫細胞においても、酸化ストレスによる $\mu$ -カルパインの活性化とマーリンの分解を認めた。しかし、U251MG細胞と比較し、 $\mu$ -カルパインの活性化とマーリンの分解には、より強度の酸化ストレスを必要とした。
3. U251MG細胞および髄膜腫細胞の両者において、酸化ストレス後にカルパインの内在性阻害蛋白質であるカルパスタチンの分解がみられた。
4. U251MG細胞および髄膜腫細胞の両者において、Z-LLal処理によりマーリンの分解およびカルパスタチンの分解の抑制がみられ、活性化型 $\mu$ -カルパインによるマーリンとカルパスタチンの分解が示唆された。
5. 蛍光免疫細胞化学染色によると、正常マーリンと酸化ストレス後の $\mu$ -カルパインは共に形質膜で強く発現していたが、ストレス後にはマーリンは形質膜から細胞質や核膜へ移動していた。したがって、酸化ストレスによって活性化された $\mu$ -カ



ルパインが、本来形質膜で機能すべきマーリンを過剰分解するために、髄膜腫細胞間に接触障害がかからなくなることが腫瘍発生の一因と推察された。

以上の結果より、中高年に多発する特発性髄膜腫の発生メカニズムとして、老化に伴って生じるフリーラジカルが、 $\mu$ -カルパインを活性化し、マーリンを過剰分解していることが推察された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部脳神経外科学講座の山下純宏教授に深甚なる謝辞を表します。また、終始直接の御指導を賜りました同教室の山崎哲盛助教授を始め、御助言を頂いた熊本大学医学部腫瘍医学講座の佐谷秀行教授、中尾光善博士、金沢大学医学部生化学第二講座の山本 博教授、ならびに米倉秀人助教授に心から感謝します。さらに、貴重な抗体を頂き、御助言、御指導を賜った理化学研究所脳科学総合研究センターの西道隆臣博士、東京大学医科学研究所の大海 忍博士に心から感謝します。最後に、御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部脳神経外科学講座の東馬康郎助手、野村素弘助手を始め、皆様に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Evans DG, Huson SM, Donnai D, Neary W, Blair V, Teare D, Newton V, Strachan T, Ramsden R, Harris R. A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness, and confirmation of maternal transmission effect on severity. *J Med Genet* 29: 841-846, 1992
- 2) Evans DG, Huson SM, Donnai D, Neary W, Blair V, Newton V, Strachan T, Harris R. A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. II. Guidelines for genetic counselling. *J Med Genet* 29: 847-852, 1992
- 3) Martuza RL, Eldridge R. Neurofibromatosis 2(bilateral acoustic neurofibromatosis). *N Engl J Med* 318: 684-688, 1988
- 4) 松谷雅生, 黒岩敏彦, 太田富雄. 脳神経外科学 (太田富雄, 松谷雅生編), 改訂8版, 437-460 頁, 金芳堂, 京都, 2000
- 5) Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A. Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology* 49: 267-270, 1997
- 6) Gutmann DH, Geist RT, Xu Hm, Kim JS, Saporito-Irwin S. Defects in neurofibromatosis 2 protein function can arise at multiple levels. *Hum Mol Genet* 7: 335-345, 1998
- 7) Koga H, Araki N, Takeshima H, Nishi T, Hirota T, Kimura Y, Nakao M, Saya H. Impairment of cell adhesion by expression of the mutant neurofibromatosis type 2 (NF2) genes which lack exons in the ERM-homology domain. *Oncogene* 17: 801-810, 1998
- 8) Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjold M, Collins VP. Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nature Genet* 6: 180-184, 1994
- 9) Merel P, Khe HX, Sanson M, Bijlsma E, Rouleau G, Laurent-Puig P, Pulst S, Baser M, Lenoir G, Sterkers JM, Philippon J, Resche F, Mautner VF, Fischer G, Hulsebos T, Aurias A, Delattre, Thomas G. Screening for germ-line mutations in the NF2 gene. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 117-127, 1995
- 10) Lekanne Deprez RH, Bianchi AB, Groen NA, Seizinger BR, Hagemeijer A, van Drunen E, Bootsma D, Koper JW, Avezaat CJ, Kley N. Frequent NF2 gene transcript mutations in sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. *Am J Hum Genet* 54: 1022-1029, 1994
- 11) Harada T, Irving RM, Xuereb JH, Barton DE, Hardy DG, Moffat DA, Maher ER. Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene in sporadic meningioma. *J Neurosurg* 84: 847-851, 1996
- 12) Bijlsma EK, Brouwer-Mladin R, Bosch DA, Westerveld A, Hulsebos TJ. Molecular characterization of chromosome 22 deletions in schwannomas. *Genes Chromosomes Cancer* 5: 201-205, 1992
- 13) Twist EC, Rutledge MH, Rousseau M, Sanson M, Papi L, Merel P, Delattre O, Thomas G, Rouleau GA. The neurofibromatosis type 2 gene is inactivated in schwannomas. *Hum Mol Genet* 3: 147-151, 1994
- 14) Welling DB, Guida M, Goll F, Pearl DK, Glasscock ME, Pappas DG, Linthicum FH, Rogers D, Prior TW. Mutational spectrum in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic and familial schwannomas. *Hum Genet* 98: 189-193, 1996
- 15) MacCollin M, Ramesh V, Jacoby LB, Louis DN, Rubio MP, Pulaski K, Trofatter JA, Short MP, Bove C, Eldridge R, et al. Mutational analysis of patients with neurofibromatosis 2. *Hum Genet* 55: 314-320, 1994
- 16) Zucman-Rossi J, Legoix P, Der Sarkissian H, Cheret G, Sor F, Bernardi A, Cazes L, Giraud S, Ollagnon E, Lenoir G, Thomas G. NF2 gene in neurofibromatosis type 2 patients. *Hum Mol Genet* 7: 2095-2101, 1998
- 17) Stemmer-Rachamimov AO, Xu L, Gonzalez-Agosti C, Burwick JA, Pinney D, Beauchamp R, Jacoby LB, Gusella JF, Ramesh V, Louis DN. Universal absence of merlin, but not other ERM family members, in schwannomas. *Am J Pathol* 151: 1649-1654, 1997
- 18) Lee JH, Sundaram V, Stein DJ, Kinney SE, Stacey DW, Golubic M. Reduced expression of schwannomin/merlin in human sporadic meningiomas. *Neurosurgery* 40: 578-587, 1997
- 19) Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, Takeshima H, Nishi T, Yamashima T, Saido TC, Yamasaki T, Moritake K, Saya H, Nakao M. The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nat Med* 4: 915-22, 1998
- 20) Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J* 8: 814-822, 1994
- 21) Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T, Kinbara K, Ishiura S. Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376: 523-529, 1995
- 22) Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* 328: 721-732, 1997
- 23) Melloni E, Michetti M, Salamino F, Minafra R, Pontremoli S. Modulation of the calpain autolysis by calpastatin and phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 193-197, 1996
- 24) Yamashima T, Saido TC, Takita M, Miyazawa A, Yamano J,

- Miyakawa A, Nishijyo H, Yamashita J, Kawashima S, Ono T, Yoshioka T. Transient brain ischaemia provokes  $\text{Ca}^{2+}$ , PIP2 and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys. *Eur J Neurosci* 8: 1932-1944, 1996
- 25) Vilei EM, Calderara S, Anagli J, Berardi S, Hitomi K, Maki M, Carafoli E. Functional properties of recombinant calpain I and of mutants lacking domains III and IV of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 272: 25802-25808, 1997
- 26) Schoonbroodt S, Ferreira V, Best-Belpomme M, Boelaert JR, Legrand-Poels S, Korner M, Piette J. Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress. *J Immunol* 164: 4292-4300, 2000
- 27) Ray SK, Fidan M, Nowak MW, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL. Oxidative stress and  $\text{Ca}^{2+}$  influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells. *Brain Res* 852: 326-334, 2000
- 28) Ray SK, Fidan M, Nowak MW, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL. Oxidative stress and  $\text{Ca}^{2+}$  influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells. *Brain Res* 852: 326-334, 2000
- 29) Yamashita T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 62: 273-295, 2000
- 30) Ray SK, Wilford GG, Crosby CV, Hogan EL, Banik NL. Diverse stimuli induce calpain overexpression and apoptosis in C6 glioma cells. *Brain Res* 829: 18-27, 1999
- 31) Andersson M, Sjostrand J, Petersen A, Karlsson JO. Calcium-dependent proteolysis in rabbit lens epithelium after oxidative stress. *Ophthalmic Res* 30: 157-167, 1998
- 32) Kinbara K, Ishiura S, Tomioka S, Sorimachi H, Jeong SY, Amano S, Kawasaki H, Kolmerer B, Kimura S, Labeit S, Suzuki K. Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem J* 335: 589-596, 1998
- 33) Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405: 360-364, 2000
- 34) Mouatt-Prigent A, Karlsson JO, Agid Y, Hirsch EC. Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death? *Neuroscience* 73: 979-987, 1996
- 35) Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. *Histological Typing of Tumors of the Central Nervous System*. 2nd ed, p33-37, Springer-Verlag, Berlin, 1993
- 36) Jensen RL, Origitano TC, Lee YS, Weber M, Wurster RD. In vitro growth inhibition of growth factor-stimulated meningioma cells by calcium channel antagonists. *Neurosurgery* 36: 365-374, 1995
- 37) Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, Ito H, Kawashima S. Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem (Tokyo)* 119: 572-576, 1996
- 38) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- 39) McCracken E, Hunter AJ, Patel S, Graham DI, Dewar D. Calpain activation and cytoskeletal protein breakdown in the corpus callosum of head-injured patients. *J Neurotrauma* 16: 749-761, 1999
- 40) Nagao S, Saido TC, Akita Y, Tsuchiya T, Suzuki K, Kawashima S. Calpain-calpastatin interactions in epidermoid carcinoma KB cells. *J Biochem (Tokyo)* 115: 1178-1184, 1994
- 41) Melloni E, Michetti M, Salamino F, Minafra R, Pontremoli S. Modulation of the calpain autolysis by calpastatin and phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 193-197, 1996
- 42) Grynspan F, Griffin WB, Mohan PS, Shea TB, Nixon RA. Calpains and calpastatin in SH-SY5Y neuroblastoma cells during retinoic acid-induced differentiation and neurite outgrowth: comparison with the human brain calpain system. *J Neurosci Res* 48: 181-191, 1997
- 43) Blomgren K, Hallin U, Andersson AL, Puka-Sundvall M, Bahr BA, McRae A, Saido TC, Kawashima S, Hagberg H. Calpastatin is up-regulated in response to hypoxia and is a suicide substrate to calpain after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Biol Chem* 274: 14046-14052, 1999
- 44) Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* 274: 34507-34510, 1999
- 45) Huang L, Ichimaru E, Pestonjamas K, Cui X, Nakamura H, Lo GY, Lin FI, Luna EJ, Furthmayr H. Merlin differs from moesin in binding to F-actin and in its intra- and intermolecular interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 548-553, 1998
- 46) Koga H, Araki N, Takeshima H, Nishi T, Hirota T, Kimura Y, Nakao M, Saya H. Impairment of cell adhesion by expression of the mutant neurofibromatosis type 2 (NF2) genes which lack exons in the ERM-homology domain. *Oncogene* 17: 801-810, 1998
- 47) Xu HM, Gutmann DH. Merlin differentially associates with the microtubule and actin cytoskeleton. *J Neurosci Res* 51: 403-415, 1998
- 48) Murthy A, Gonzalez-Agosti C, Cordero E, Pinney D, Candia C, Solomon F, Gusella J, Ramesh V. NHE-RF, a regulatory cofactor for  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins. *J Biol Chem* 273: 1273-1276, 1998
- 49) Tsukita S, Yonemura S. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 9: 70-75, 1997
- 50) Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita Sa, Tsukita Sh. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140: 647-657, 1998
- 51) Bretscher A. Rapid phosphorylation and reorganization of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor. *J Cell Biol* 108: 921-930, 1989
- 52) Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita Sh, Tsukita Sa. Regulation mechanism of

- ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* 135: 37-51, 1996
- 53) Matsui T, Yonemura S, Tsukita Sh, Tsukita Sa. Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* 9: 1259-1262, 1999
- 54) Takeuchi K, Sato N, Kasahara H, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita Sa, Tsukita Sh. Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J Cell Biol* 125: 1371-1384, 1994
- 55) Paglini G, Kunda P, Quiroga S, Kosik K, Caceres A. Suppression of radixin and moesin alters growth cone morphology, motility, and process formation in primary cultured neurons. *J Cell Biol* 143: 443-55, 1998
- 56) Maeda M, Matsui T, Imamura M, Tsukita Sh, Tsukita Sa. Expression level, subcellular distribution and rho-GDI binding affinity of merlin in comparison with Ezrin/Radixin/Moesin proteins. *Oncogene* 18: 4788-4797, 1999
- 57) Stemmer-Rachamimov AO, Xu L, Gonzalez-Agosti C, Burwick JA, Pinney D, Beauchamp R, Jacoby LB, Gusella JF, Ramesh V, Louis DN. Universal absence of merlin, but not other ERM family members, in schwannomas. *Am J Pathol* 151: 1649-1654, 1997
- 58) Ueki K, Wen-Bin C, Narita Y, Asai A, Kirino T. Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Res* 59: 5995-5998, 1999
- 59) Papi L, De Vitis LR, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Montali E, Bigozzi U. Somatic mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet* 95: 347-351, 1995
- 60) Ruttledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjold M, Collins VP, Dumanski JP, Rouleau GA. Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 6: 180-184, 1994
- 61) Tolmasoff JM, Ono T, Cutler RG. Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2777-2781, 1980
- 62) Sohal RS, Allen RG. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp Gerontol* 25: 499-522, 1990
- 63) Chakrabarti AK, Dasgupta S, Gadsden RH Sr, Hogan EL, Banik NL. Regulation of brain  $\mu$  calpain  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity by mixtures of membrane lipids: activation at intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level. *J Neurosci Res* 44: 374-380, 1996
- 64) Saido TC, Nagao S, Shiramine M, Tsukaguchi M, Sorimachi H, Murofushi H, Tsuchiya T, Ito H, Suzuki K. Autolytic transition of  $\mu$ -calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between the pre- and post-autolysis forms. *J Biochem (Tokyo)* 111: 81-86, 1992
- 65) Melloni E, Michetti M, Salamino F, Pontremoli S. Molecular and functional properties of a calpain activator protein specific for mu-isoforms. *J Biol Chem* 273: 12827-12831, 1998
- 66) Yamashima T. On arachnoid villi and meningiomas: functional implication of ultrastructure, cell adhesion mechanisms, and extracellular matrix composition. *Pathol Oncol Res* 2: 144-149, 1996
- 67) Yamashima T, Yamashita J. Histological, ultrastructural and chromatographical discrimination of phospholipids in meningiomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 80: 255-259, 1990
- 68) Hitomi K, Uchiyama Y, Ohkubo I, Kunimatsu M, Sasaki M, Maki M. Purification and characterization of the active-site-mutated recombinant human mu-calpain expressed in baculovirus-infected insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 681-685, 1998
- 69) Vilei EM, Calderara S, Anagli J, Berardi S, Hitomi K, Maki M, Carafoli E. Functional properties of recombinant calpain I and of mutants lacking domains III and IV of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 272: 25802-25808, 1997
- 70) Takano E, Ma H, Yang HQ, Maki M, Hatanaka M. Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains. *FEBS Lett* 362: 93-97, 1995
- 71) Yang HQ, Ma H, Takano E, Hatanaka M, Maki M. Analysis of calcium-dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of mu-calpain large subunit. *J Biol Chem* 269: 18977-18984, 1994
- 72) Ma H, Yang HQ, Takano E, Lee WJ, Hatanaka M, Maki M. Requirement of different subdomains of calpastatin for calpain inhibition and for binding to calmodulin-like domains. *J Biochem (Tokyo)* 113: 591-599, 1993
- 73) Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber R, Masumoto H, Nakagawa K, Irie A, Sorimachi H, Bourenkow G, Bartunik H, Suzuki K, Bode W. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 588-592, 2000
- 74) Tullio RD, Passalacqua M, Aversa M, Salamino F, Melloni E, Pontremoli S. Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation. *Biochem J* 343: 467-472, 1999
- 75) Deguen B, Merel P, Goutebroze L, Giovannini M, Reggio H, Arpin M, Thomas G. Impaired interaction of naturally occurring mutant NF2 protein with actin-based cytoskeleton and membrane. *Hum Mol Genet* 7: 217-226, 1998
- 76) Bretscher A. Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr Opin Cell Biol* 11: 109-116, 1999
- 77) Mangeat P, Roy C, Martin M. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 9: 187-192, 1999
- 78) Mack EE, Wilson CB. Meningiomas induced by high-dose cranial irradiation. *J Neurosurg* 79: 28-31, 1993
- 79) Gutmann DH, Sherman L, Seftor L, Haipek C, Hoang Lu K,

Hendrix M. Increased expression of the NF2 tumor suppressor gene product, merlin, impairs cell motility, adhesion and spreading. *Hum Mol Genet* 8: 267-275, 1999

80) Pelton PD, Sherman LS, Rizvi TA, Marchionni MA, Wood P, Friedman RA, Ratner N. Ruffling membrane, stress fiber, cell spreading and proliferation abnormalities in human Schwannoma cells. *Oncogene* 17: 2195-2209, 1998

81) Shaw RJ, McClatchey AI, Jacks T. Regulation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor protein, merlin, by adhesion and growth arrest stimuli. *J Biol Chem* 273: 7757-7764,

1998

82) Sherman L, Xu HM, Geist RT, Saporito-Irwin S, Howells N, Ponta H, Herrlich P, Gutmann DH. Interdomain binding mediates tumor growth suppression by the NF2 gene product. *Oncogene* 15: 2505-2509, 1997

83) Jensen RL, Petr M, Wurster RD. Calcium channel antagonist effect on in vitro meningioma signal transduction pathways after growth factor stimulation. *Neurosurgery* 46: 692-703, 2000

**Activation of  $\mu$ -calpain by Oxidative Stress and Proteolysis of NF2 Protein (Merlin)** Takuro Kaneko.  
Department of Neurosurgery. School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **110**, 65 — 76 (2001)

**Key words** merlin, calpain, oxidative stress, meningioma

#### Abstract

The neurofibromatosis type 2 (NF2) gene product, merlin, is a tumor suppressor protein that is often found mutated in meningiomas and schwannomas. Recently, it has been reported that aside from NF2 mutations, the proteolysis of merlin mediated by activated calpain is involved in the development of certain NF2-related tumors. Although meningiomas are well known to occur more frequently in the aged female, it is unknown why the activation of calpain occurs in them. In this study, the author speculated that age related production of free radicals might be one of the causes of calpain activation, and examined the relationship between activated  $\mu$ -calpain and merlin under oxidative stress in cultured cells. The materials studied were twelve sporadic meningiomas and their primary cultured cells. A malignant glioma cell line (U251MG), which was not usually related to NF2, was used as a positive control of full-length merlin and negative control of activated  $\mu$ -calpain. In spite of the consistent expressions of activated  $\mu$ -calpain in 11 meningioma tissues, this activation disappeared after culturing, and full-length merlin was expressed in 8 of 11 cases. Treatment with hydrogen peroxide induced both  $\mu$ -calpain cleavage of merlin and the reduction of an intrinsic calpain inhibitor, calpastatin. These proteolyses were significantly blocked by a specific calpain inhibitor, Z-LLal (5  $\mu$  M). According to the immunocytochemistry, full-length merlin was co-localized with activated  $\mu$ -calpain at the plasma membrane, and then after  $\mu$ -calpain activation the merlin fragments translocated to the perinuclear or cytoplasmic region. These findings suggest that the activated  $\mu$ -calpain induced by the oxidative stress cleaved the merlin to impair the signal pathway for the cell adhesion and led to meningioma due to the loss of the contact inhibition.